

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. September 2005 (09.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/083435 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: **G01N 33/543**,
C12Q 1/68, C12N 11/08

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002137

(22) Internationales Anmeldedatum:
1. März 2005 (01.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 010 430.1 1. März 2004 (01.03.2004) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **RÜHE, Jürgen** [DE/DE]; Im Längenthal 15,
79356 Eichstetten (DE). **KLAPPROTH, Holger** [DE/DE];
Kehlerstrasse 12, 79108 Freiburg (DE).

(74) Anwalt: **HUWER, Andreas**; Grünwälderstr. 10-14, Post-
fach 1305, 79013 Freiburg i.Br. (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR COVALENTLY IMMOBILISING BIOMOLECULES ON ORGANIC SURFACES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KOVALENTEN IMMOBILISIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN AN ORGANISCHEN
OBERFLÄCHEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for covalently immobilising probe-biomolecules on organic surfaces by means
of photoreactive cross-linking agents which are used for covalently immobilising the probe-biomolecules on an organic surface.
The inventive immobilising method consists in applying said probe-biomolecules and photoactive polymers and afterwards in cross-
linking.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an or-
ganischen Oberflächen unter Verwendung von photoreaktiven Vernetzern, mit denen die Sonden-Biomoleküle an einer organischen
Oberfläche kovalent immobilisiert werden. Die Immobilisierung findet dabei durch Aufbringen der Sonden-Biomoleküle und der
photoreaktiven Polymere und anschliessende Vernetzung statt.



WO 2005/083435 A1

Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Biomolekülen an organischen Oberflächen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-
5 Biomolekülen an organischen Oberflächen wie Polymeroberflächen oder Oberflächen von anorganischen Substraten, modifiziert mit selbstorganisierten Monolagen unter Verwendung von photoreaktiven Vernetzern mit denen die Sonden-Biomoleküle an einer organischen Oberfläche kovalent immobilisiert werden. Als
10 Vernetzer werden Polymere oder Copolymere mit photoreaktiven Gruppen verwendet, die nach dem Aufbringen sowohl das Sonden-Biomolekül binden, als auch die kovalente Bindung zur Oberfläche gewährleisten.

In den letzten Jahren haben in der Analytik Techniken immer mehr an Bedeutung gewonnen und es sind zahlreiche Festphasensysteme auf der Grundlage von
15 selbstorganisierten Monolayern (engl. »self-assembled monolayers«, »SAMs«) aus bifunktionellen Molekülen (engl. »linker«) entwickelt worden, über die spezifisch Probenmoleküle an die Oberfläche des festen Trägers gekoppelt bzw. konjugiert werden, an der dann auch der Nachweis mit Hilfe von geeigneten Markierungen (beispielsweise radioaktiv, gefärbt, fluoreszierend) erfolgt.

20 Für diese Systeme hat sich in Analogie zu den elektronischen Mikro-Chips die Bezeichnung Sensor-Chips eingebürgert. Im Falle der Konjugation von biologischen Molekülen (sog. »Biokonjugation«) an solche Sensor-Chips, beispielsweise Oligonukleotiden oder Antikörpern, spricht man auch von Bio-Chips. Die Kopplung an die
25 Trägeroberfläche kann direkt oder indirekt erfolgen. Ein Beispiel für eine indirekte Kopplung ist die Kopplung einer nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz durch Hybridisierung an ein immobilisiertes, komplementäres Oligonukleotid als Sonde. In diesem Fall hat die Verwendung der Sonde noch den Vorteil der natürlichen Spezifität der Wechselwirkung biologischer Makromoleküle.

30 Typischerweise werden zur Herstellung von Sensor-Chips Oberflächen aus Metall- bzw. Halbmetalloxiden, wie z.B. Aluminiumoxid, Quarzglas, Glas, in eine Lösung von bifunktionellen Molekülen (sog. »Linker«), die beispielsweise eine Halogensilan- (z.B.

Chlorsilan-) oder Alkoxysilangruppe zur Kopplung an die Trägeroberfläche aufweisen, getaucht, so dass sich ein selbstorganisierter Monolayer (SAM) bildet. Dieser weist in diesem Fall eine Dicke von wenigen Ångström aus. Die Kopplung der Linker an die Proben- oder Sondenmoleküle erfolgt über eine geeignete weitere funktionelle Gruppe, beispielsweise eine Amino- oder Epoxygruppe (EP 1 176 422 A1). Geeignete bifunktionelle Linker für die Kopplung einer Vielzahl von Proben- oder Sonden-Molekülen, insbesondere auch biologischen Ursprungs, an eine Vielzahl von Trägeroberflächen sind dem Fachmann gut bekannt, vgl. beispielsweise »Bioconjugate Techniques« von G. T. Hermanson, Academic Press 10 1996.

Ein Nachteil dieser reaktiven (und dadurch empfindlichen) Oberflächen, z.B. Oberflächen mit Epoxy-, Aldehyd- oder Aminofunktionen, ist deren oft nur begrenzte Haltbarkeit (wenige Wochen), so dass sie unter Luftabschluss und / oder im Dunklen 15 gelagert werden müssen. Zudem sind die resultierenden Bindungen zu den Biomolekülen oder der Oberfläche nicht langzeitstabil. Alle diese Bindungen unterliegen Effekten, wie der Hydrolyse, wodurch die Verwendbarkeit und das Anwendungsspektrum gravierend eingeschränkt werden. Insbesondere erlauben es die bestehenden Methoden nicht, auf hydrophile Oberflächen, bzw. hydrophil 20 beschichtete Oberflächen zu drucken, ohne dass die Gefahr besteht, dass die Tropfen zerlaufen und dadurch das Druckergebnis zerstört wird.

Die Immobilisierung von beispielsweise Nukleinsäuren auf nicht reaktiven Polymer- bzw. Kunststoff-/Plastikoberflächen (z. B. als Sonden zur Herstellung von Sensor-/Bio- 25 Chips) mit herkömmlichen Methoden ist aber kompliziert und erfordert sehr viel Aufwand.

Aufgabe der Erfindung ist daher die Bereitstellung eines einfachen und schnell durchzuführenden Verfahrens zur kovalenten Immobilisierung von Sonden- 30 Biomolekülen an organischen Oberflächen, wie Polymeroberflächen oder mit organischen Substanzen modifizierte anorganische Substrate. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine im Vergleich zum Stand der Technik wesentlich höhere Bindekapazität auf Trägersubstraten zu erreichen. Bisherige Ansätze wie z.B. EP 1 144 677 A2 konnten dieses Problem nicht zufrieden stellend lösen. Eine weitere

Aufgabe dieser Erfindung ist die Bereitstellung einer stabilen Kopplungschemie und einer verbesserten Bedruckbarkeit von hydrophilen und hydrophoben Oberflächen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch folgende technische Lehre gelöst:

- 5 a) mindestens ein Sonden-Biomolekül mit wenigstens einem Polymer und/oder Copolymer, das mindestens zwei photoreaktiven Gruppen pro Molekül aufweist, gelöst wird und
- b) die Mischung aus (a) auf eine Oberfläche aufgebracht und durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge daran kovalent immobilisiert
10 wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind in dem Polymer eine Vielzahl an photovernetzbaaren Gruppen vorhanden, so dass bei dem Vernetzen die Biomoleküle an das Polymer kovalent gebunden werden, die Polymermoleküle an das
15 Substrat kovalent gebunden werden, und die Polymerketten untereinander quervernetzt werden.

Der Vorteil der Erfindung liegt in der Möglichkeit, auf unreaktive Oberflächen (z.B. silansierte Glasträger oder Substrate aus handelsüblichen Kunststoffen) ein viskoses
20 Medium, zu drucken, das sehr einfach zu immobilisieren ist, nämlich durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge. Gleichzeitig wird durch diesen Vorgang die Menge an Analyt, die gekoppelt werden kann, wesentlich erhöht, da eine pseudo-dreidimensionale Matrix aufgebaut wird. Klassische Probleme dreidimensionaler Matrices, wie z.B. Verlauffeffekte des Mediums beim Drucken auf
25 Polymergele, werden auf diese Weise zusätzlich gelöst. Zudem muss nicht auf reaktive (und dadurch empfindliche) Oberflächen gedruckt werden. Reaktive Oberflächen sind z.B. Oberflächen mit Epoxy-, Aldehyd- oder Aminofunktionen. Reaktive Oberflächen weisen oft nur eine begrenzte Haltbarkeit (wenige Wochen) auf und müssen unter Luftabschluss gelagert werden. Keine reaktive Oberfläche
30 bedeutet, dass Träger aus z.B. Polystyrol oder Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet werden können, die jahrelang stabil sind. Ein weiter Vorteil ist, dass z.B. die Polymeroberflächen nicht durch vorgeschaltete Prozessschritte wie z.B. Plasmaprozesse hydrophilisiert werden müssen, da die Zugänglichkeit der Oberfläche zum Beispiel bei der oben definierten alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens durch das gekoppelte (quellbare, benetzbare) Copo-
35

lymer hergestellt wird. Abgesehen davon sind außerdem die Oberflächeneigenschaften des Substrats (z.B. der Sensoroberfläche) in einfacher Weise sehr genau zu kontrollieren. Ein Beispiel für eine wichtige Oberflächeneigenschaft, die mit Hilfe des hier beschriebenen Verfahrens einfach kontrolliert werden kann, ist die Benetzbarkeit. Ein weiterer Vorteil ist die vereinfachte Analytik, da im Prinzip nur das Volumen des aufgetragenen Tropfens bestimmt werden muss und sich daraus die Anzahl der immobilisierten Sonden unmittelbar ergibt. Dies ist bei den Verfahren des Standes der Technik zur Bindung von beispielsweise DNA an SAMs kein triviales Unterfangen.

Die Erfindung betrifft ferner eine organische Oberfläche wie eine Polymeroberfläche mit kovalent, vorzugsweise unter Musterbildung (z.B. durch Aufdrucken), darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen, die nach einem oben definierten Verfahren erhältlich ist.

Die Erfindung gibt ferner die Verwendung einer organischen Oberfläche, wie einer Polymeroberfläche, mit unter Musterbildung darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen als Sensor-Chip an und betrifft nach einer weiteren Ausführungsform außerdem ein medizinisches oder diagnostisches Instrument, das eine erfindungsgemäße organische Oberfläche, wie eine Polymeroberfläche, oder einen damit erhaltenen Sensor-Chip aufweist.

Vorteilhafte und/oder bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

In einem bevorzugten Verfahren kann/können die photoreaktive(n) Gruppe(n) unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon, Nitrophenylazid und Derivaten und Thymidin oder Derivaten davon ausgewählt werden. Weitere geeignete Photocrosslinker sind im Stand der Technik bekannt und können z.B. von Firmen wie Pierce (www.piercenet.com) bezogen werden. Generell können aber alle chemischen Gruppen verwendet werden, die bei Bestrahlung in der Lage sind radikale oder andere reaktive Gruppen zu bilden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich als organische Oberflächen z.B. Polymeroberflächen, wie Oberflächen aus Cycloolefincopolymeren (COCs), Polysty-

rol, Polyethylen, Polypropylen oder Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas). Ein geeignetes COC ist zum Beispiel das von Ticona unter dem Handelsnamen »Topas« vertriebene. Es sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass sich das erfindungsgemäße Verfahren in Abhängigkeit von den verwendeten photoreaktiven Gruppen für beliebige organische Oberflächen eignet. Geeignet sind somit beispielsweise auch mit organischen Molekülen beschichtete Oberflächen, wie mit selbstorganisierten Monolagen (engl. »self-assembled monolayers«, SAMs) beschichtete anorganische Substrate. Diese SAMs können selber völlig unreaktiv sein und somit beispielsweise aus reinen Alkylsilanen bestehen. Zusätzlich zu organischen Substraten sind auch andere Substrate geeignet, sofern diese in der Lage sind, bei radikalischen Prozessen mit organischen Molekülen stabile Bindungen einzugehen (z.B. bororganische Verbindungen).

In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das Sonden-Biomolekül beispielsweise ein Partner eines spezifisch wechselwirkenden Systems von komplementären Bindungspartnern (Rezeptor/Ligand) sein.

Rezeptoren sind beispielsweise, aber nicht ausschließlich: Nukleinsäuren und deren Derivate (RNA, DNA, LNA, PNA), Proteine, Peptide, Polypeptide und deren Derivate (Glycosamine, Antikörper, Enzyme) aber auch Fettsäuren wie z.B. Arachidonsäure und andere Verbindungen, sofern diese spezifische Wechselwirkungen mit mindestens einem zweiten Molekül eingehen können. Weiterhin größere und zusammengesetzte Strukturen wie z.B. Liposomen, Membranen und Membranfragmente, Zellen, Zelllysate, Zellfragmente, Sporen und Mikroorganismen.

Liganden sind beispielsweise, aber nicht ausschließlich: Nukleinsäuren und deren Derivate (RNA, DNA, LNA, PNA), Proteine, Peptide, Polypeptide und deren Derivate (Glycosamine, Antikörper, Enzyme) aber auch Fettsäuren wie z.B. Arachidonsäure und andere Verbindungen, sofern diese spezifische Wechselwirkungen mit mindestens einem zweiten Molekül eingehen können. Weiterhin größere und zusammengesetzte Strukturen wie z.B. Liposomen, Membranen und Membranfragmente, Zellen, Zelllysate, Zellfragmente, Sporen und Mikroorganismen.

Ein spezifisch wechselwirkendes System von komplementären Bindungspartnern kann beispielsweise auf der Wechselwirkung einer Nukleinsäure mit einer kom-

plementären Nukleinsäure, der Wechselwirkung einer Peptidnukleinsäure (PNA) mit einer Nukleinsäure, der Enzym/Substrat-, Rezeptor/Ligand-, Lectin/Zucker-, Antikörper/Antigen-, Avidin/Biotin- oder Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung beruhen.

- 5 Natürlich kann die Nukleinsäure eine DNA oder RNA sein, z.B. ein Oligonukleotid oder ein Aptamer oder auch eine sog. »LNA« wie unter www.proligo.com angeboten oder auch eine einpolymerisierbare DNA wie unter dem Handelsnamen »Acrydite« unter www.mosaic-technologies.com angeboten. Auch Peptidnukleinsäuren (PNAs) kommen in Frage.

10

Bei dem Antikörper kann es sich beispielsweise um einen polyklonalen, monoklonalen, chimären oder »Single-chain«-Antikörper oder ein funktionelles Fragment oder Derivat (mit »funktionell« ist gemeint, dass das Fragment/Derivat ein Antigen binden kann, ohne dass notwendigerweise eine Immunogenität damit verbunden ist) eines derartigen Antikörpers handeln.

15

Im Folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung unter Bezugnahme auf konkrete Ausführungsformen und Beispiele anhand von Nukleinsäuren als Sonden-Biomolekülen detaillierter erläutert. Es zeigt:

20

Fig. 1 das Vernetzen von Biomolekülen und einem Copolymer in schematischer Darstellung.

Herstellung des Copolymers:

25

Ein in Fig. 1 mit 1 bezeichnetes Copolymer kann aus einem eine UV-reaktive Gruppe 2 aufweisenden Monomer 3, einem reaktiven hydrophilen Monomer gebildet werden. Z.B. 4-Methacryloyloxybenzophenon, Dimethylacrylamid und Methacrylsäure.

30

Beispielsweise kann durch Copolymerisation von Dimethylacrylamid und 4-Methacryloyloxybenzophenon in einem 100:1 (mol/mol) Gemisch durch Zugabe von 1% AIBN (Azobisisobutyronitril) in eine Lösung der Monomeren in einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. 10% (v/v) Monomere in Chloroform) hergestellt werden. Das entstandene Copolymer kann durch Fällern mit Diethylether abgetrennt werden.

35

Das Copolymer 1 kann zum Beispiel in einem geeigneten Lösungsmittel gequollen und zum Beispiel mit 5' Oligothymine modifizierter Nukleinsäure wie DNA gemischt werden.

- 5 Das so erhaltene, in Fig. 1 links gezeigte Gemisch aus Biomolekül 4 und Copolymer 1 kann nun vermessen werden (um den DNA-Gehalt zu bestimmen) und auf fast beliebige organische Polymeroberflächen 5 als Substrat durch Drucken aufgebracht werden (Fig. 1 rechts). Die Immobilisierung des Polymers und die Vernetzung mit dem Biomolekül 4 erfolgt z.B. über UV-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von
- 10 260 nm.

- Dieses Polymer kann über ein dem Fachmann bekanntes Verfahren auf ein PMMA-Substrat gedruckt werden. Die Immobilisierung der modifizierten Polymere erfolgt hier zum einen über eine photoinduzierte Kupplungsreaktion zwischen den
- 15 im Polymer enthaltenen Benzophenon-Gruppen und dem Substrat, ausgelöst durch UV-Bestrahlung bei 260 nm und einer photoinduzierten Kupplungsreaktion zwischen dem Oligothymine und dem Polymer und/oder der photoinduzierten Kupplungsreaktion zwischen dem Benzophenon und der Nukleinsäure.

Patentansprüche

1. Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Sonden-Biomolekülen an organischen Oberflächen, bei dem
 - (a) mindestens ein Sonden-Biomolekül mit wenigstens einem Polymer und/oder Copolymer, das mindestens zwei photoreaktiven Gruppen pro Molekül aufweist, gelöst wird und
 - (b) die Mischung aus (a) auf eine Oberfläche aufgebracht und durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge daran kovalent immobilisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer ein quellbares Polymer ist, in dem pro Polymerkette mindestens zwei identische oder unterschiedliche photovernetzbare Gruppen vorhanden sind und/oder das Copolymer ein quellbares Copolymer ist, in dem pro Copolymerkette mindestens zwei identische oder unterschiedliche photovernetzbare Gruppen vorhanden sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Polymer und/oder Copolymer durch Drucken auf die Oberfläche aufgebracht und danach quervernetzt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei als photoreaktive Gruppe(n) (eine) unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon, Nitrophenylazid und Thymidin oder Derivaten davon verwendet wird/werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die photoreaktive(n) Gruppe(n) ultraviolett-reaktiv ist (sind).
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei in dem in Anspruch 1 definierten Schritt (b) die Aufbringung durch Aufdrucken unter Musterbildung erfolgt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Polymeroberfläche aus Cycloolefincopolymeren, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen oder Polymethylmethacrylat besteht.
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei als Sonden-Biomolekül ein Partner eines spezifisch wechselwirkenden Systems von komplementären Bindungspartnern (Rezeptor/Ligand) verwendet wird.
- 10 9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das spezifisch wechselwirkende System von komplementären Bindungspartnern auf der Wechselwirkung einer Nukleinsäure mit einer komplementären Nukleinsäure, der Wechselwirkung einer Peptidnukleinsäure mit einer Nukleinsäure, der Enzym/Substrat-, Rezeptor/Effektor-, Lectin/Zucker-, Antikörper/Antigen-, Avidin/Biotin- oder -Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung beruht.
- 15 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Nukleinsäure eine DNA oder RNA oder ein Analogon davon ist.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die DNA oder RNA ein Oligonukleotid ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Antikörper ein polyklonaler, monoklonaler, chimärer oder »Single-chain«-Antikörper oder ein funktionelles Fragment oder Derivat eines derartigen Antikörpers ist.
- 25 13. Organische Oberfläche mit kovalent darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
- 30 14. Organische Oberfläche mit unter Musterbildung kovalent darauf immobilisierten Sonden-Biomolekülen, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
15. Verwendung einer organischen Oberfläche nach Anspruch 13 oder 14 als Sensor-Chip.

16. Medizinisches oder diagnostisches Instrument, das eine organische Oberfläche nach Anspruch 13 oder 14 aufweist.

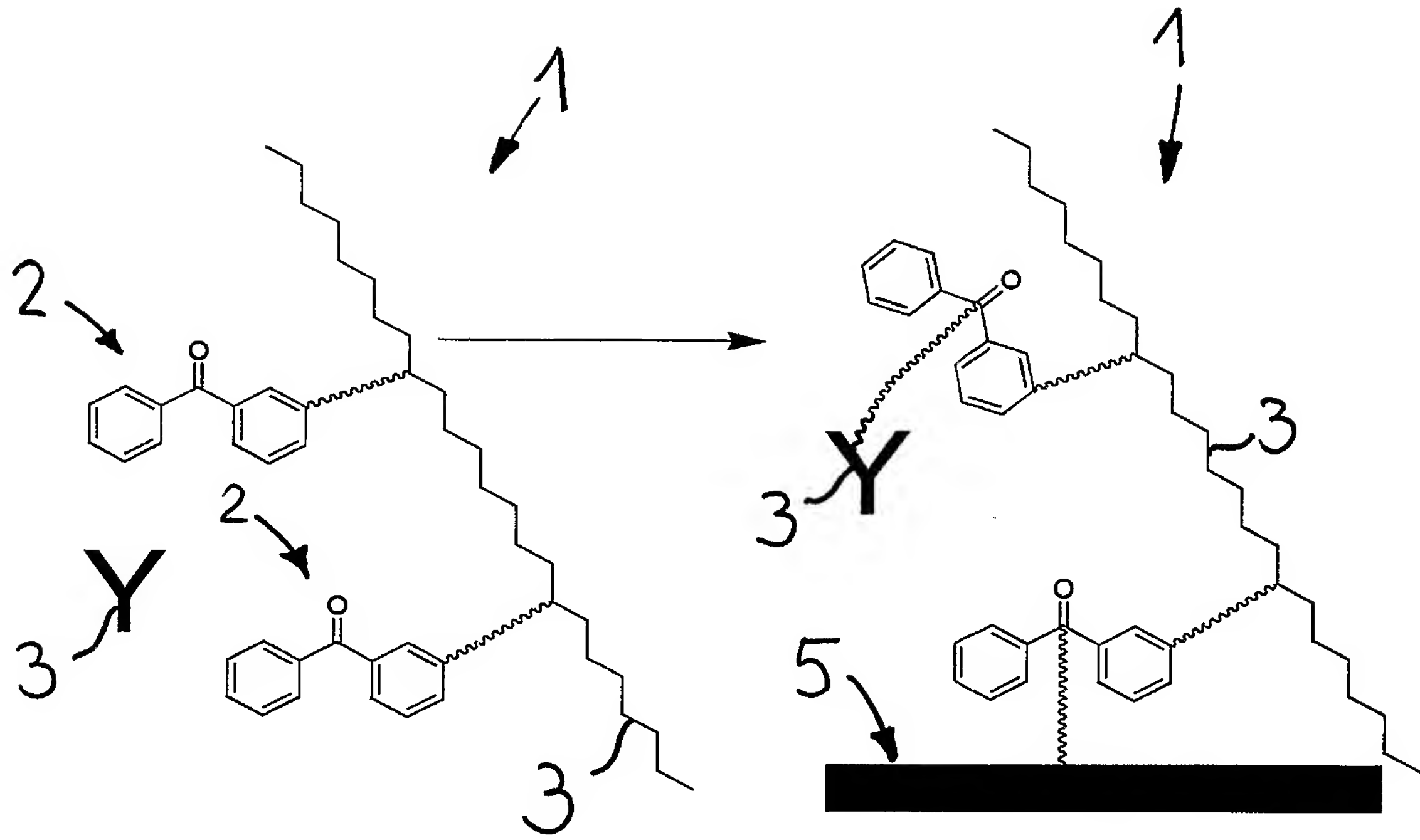


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543 C12Q1/68 C12N11/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIGRIST H ET AL: "SURFACE IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES BY LIGHT" OPTICAL ENGINEERING, SOC. OF PHOTO-OPTICAL INSTRUMENTATION ENGINEERS. BELLINGHAM, US, vol. 34, no. 8, 1 August 1995 (1995-08-01), pages 2339-2348, XP000518229 ISSN: 0091-3286 the whole document ----- -/--	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 2005

Date of mailing of the international search report

17/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weber, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/002137

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YASUhide NAKAYAMA ET AL: "DESIGN AND PROPERTIES OF PHOTOCURABLE ELECTROCONDUCTIVE POLYMERS FOR USE IN BIOSENSORS"</p> <p>ASAI JOURNAL, J.B.LIPPINCOTT CO., HAGERSTOWN, MD, US, vol. 41, no. 3, 1 July 1995 (1995-07-01), pages 418-421, XP000542925</p> <p>ISSN: 1058-2916</p> <p>abstract</p> <p>page M419, left-hand column, line 12 - line 24</p> <p>page M419, right-hand column, line 16 - line 20</p> <p>figure 1</p>	1,2,5,8,9,13,15
X	<p>-----</p> <p>US 2004/023413 A1 (OPALSKY CINDRA)</p> <p>5 February 2004 (2004-02-05)</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-3,5,8-15
X	<p>GAO H ET AL:</p> <p>"PHOTOLINKER-POLYMER-MEDIATED IMMOBILIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES, F(AB')-2 AND F(AB') FRAGMENTS"</p> <p>BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 20, no. 2, 1994, pages 251-263, XP009037548</p> <p>ISSN: 0885-4513</p> <p>abstract</p> <p>page 255, line 31 - line 42</p> <p>page 256, line 13 - line 30</p> <p>page 262, line 20 - line 24</p> <p>figure 1</p> <p>-----</p>	1,2,5,7-9,12,13,15,16
X	<p>-----</p> <p>US 6 346 376 B1 (SIGRIST HANS ET AL)</p> <p>12 February 2002 (2002-02-12)</p> <p>column 7, line 25 - line 30</p> <p>column 9, line 49 - line 64</p> <p>example 3</p> <p>figure 2</p> <p>-----</p>	1-3,5-9,12-16
A	<p>-----</p> <p>US 6 372 813 B1 (JOHNSON TRAVIS ET AL)</p> <p>16 April 2002 (2002-04-16)</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>-----</p> <p>US 6 077 698 A (SWAN ET AL)</p> <p>20 June 2000 (2000-06-20)</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-16

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/002137

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VASILISKOV A V ET AL: "FABRICATION OF MICROARRAY OF GEL-IMMOBILIZED COMPOUNDS ON A CHIP BYCOPOLYMERIZATION" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 27, no. 3, September 1999 (1999-09), pages 592,594,596-598,600,60, XP000849476 ISSN: 0736-6205 figure 3</p> <p>-----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/002137

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004023413	A1	05-02-2004	AU 2002351164 A1 WO 03046144 A2	10-06-2003 05-06-2003
US 6346376	B1	12-02-2002	EP 0886141 A1	23-12-1998
US 6372813	B1	16-04-2002	AT 276516 T AU 768326 B2 AU 5636200 A CA 2378072 A1 DE 60013826 D1 EP 1190254 A2 JP 2003524150 T WO 0101143 A2 US 2002146730 A1 US 2003096265 A1 US 2003124525 A1 US 2003078314 A1	15-10-2004 11-12-2003 31-01-2001 04-01-2001 21-10-2004 27-03-2002 12-08-2003 04-01-2001 10-10-2002 22-05-2003 03-07-2003 24-04-2003
US 6077698	A	20-06-2000	US 5714360 A AU 731249 B2 AU 7553196 A CA 2236588 A1 DE 69632541 D1 EP 0862624 A1 JP 2000500440 T WO 9716544 A1	03-02-1998 29-03-2001 22-05-1997 09-05-1997 24-06-2004 09-09-1998 18-01-2000 09-05-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002137

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/543 C12Q1/68 C12N11/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

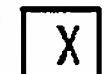
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SIGRIST H ET AL: "SURFACE IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES BY LIGHT" OPTICAL ENGINEERING, SOC. OF PHOTO-OPTICAL INSTRUMENTATION ENGINEERS. BELLINGHAM, US, Bd. 34, Nr. 8, 1. August 1995 (1995-08-01), Seiten 2339-2348, XP000518229 ISSN: 0091-3286 das ganze Dokument ----- -/--	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Mai 2005

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

17/05/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Weber, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>YASUhide NAKAYAMA ET AL: "DESIGN AND PROPERTIES OF PHOTOCURABLE ELECTROCONDUCTIVE POLYMERS FOR USE IN BIOSENSORS"</p> <p>ASAIO JOURNAL, J.B.LIPPINCOTT CO., HAGERSTOWN, MD, US, Bd. 41, Nr. 3, 1. Juli 1995 (1995-07-01), Seiten 418-421, XP000542925</p> <p>ISSN: 1058-2916</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>Seite M419, linke Spalte, Zeile 12 - Zeile 24</p> <p>Seite M419, rechte Spalte, Zeile 16 - Zeile 20</p> <p>Abbildung 1</p>	1,2,5,8,9,13,15
X	<p>-----</p> <p>US 2004/023413 A1 (OPALSKY CINDRA)</p> <p>5. Februar 2004 (2004-02-05)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-3,5,8-15
X	<p>GAO H ET AL:</p> <p>"PHOTOLINKER-POLYMER-MEDIATED IMMOBILIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES, F(AB')-2 AND F(AB') FRAGMENTS"</p> <p>BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, US, Bd. 20, Nr. 2, 1994, Seiten 251-263, XP009037548</p> <p>ISSN: 0885-4513</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>Seite 255, Zeile 31 - Zeile 42</p> <p>Seite 256, Zeile 13 - Zeile 30</p> <p>Seite 262, Zeile 20 - Zeile 24</p> <p>Abbildung 1</p> <p>-----</p>	1,2,5,7-9,12,13,15,16
X	<p>-----</p> <p>US 6 346 376 B1 (SIGRIST HANS ET AL)</p> <p>12. Februar 2002 (2002-02-12)</p> <p>Spalte 7, Zeile 25 - Zeile 30</p> <p>Spalte 9, Zeile 49 - Zeile 64</p> <p>Beispiel 3</p> <p>Abbildung 2</p> <p>-----</p>	1-3,5-9,12-16
A	<p>-----</p> <p>US 6 372 813 B1 (JOHNSON TRAVIS ET AL)</p> <p>16. April 2002 (2002-04-16)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>-----</p> <p>US 6 077 698 A (SWAN ET AL)</p> <p>20. Juni 2000 (2000-06-20)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-16

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>VASILISKOV A V ET AL: "FABRICATION OF MICROARRAY OF GEL-IMMOBILIZED COMPOUNDS ON A CHIP BYCOPOLYMERIZATION"</p> <p>BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US,</p> <p>Bd. 27, Nr. 3, September 1999 (1999-09),</p> <p>Seiten 592,594,596-598,600,60, XP000849476</p> <p>ISSN: 0736-6205</p> <p>Abbildung 3</p> <p>-----</p>	1-16

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002137

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2004023413 A1	05-02-2004	AU 2002351164 A1 WO 03046144 A2	10-06-2003 05-06-2003
US 6346376 B1	12-02-2002	EP 0886141 A1	23-12-1998
US 6372813 B1	16-04-2002	AT 276516 T AU 768326 B2 AU 5636200 A CA 2378072 A1 DE 60013826 D1 EP 1190254 A2 JP 2003524150 T WO 0101143 A2 US 2002146730 A1 US 2003096265 A1 US 2003124525 A1 US 2003078314 A1	15-10-2004 11-12-2003 31-01-2001 04-01-2001 21-10-2004 27-03-2002 12-08-2003 04-01-2001 10-10-2002 22-05-2003 03-07-2003 24-04-2003
US 6077698 A	20-06-2000	US 5714360 A AU 731249 B2 AU 7553196 A CA 2236588 A1 DE 69632541 D1 EP 0862624 A1 JP 2000500440 T WO 9716544 A1	03-02-1998 29-03-2001 22-05-1997 09-05-1997 24-06-2004 09-09-1998 18-01-2000 09-05-1997